



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

GABRIELA VIDOTTO CAVALLIERI

**ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA EM RATOS EXPOSTOS CRONICAMENTE POR
VIA INALATÓRIA AO HERBICIDA ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D)**

Presidente Prudente - SP
2019

GABRIELA VIDOTTO CAVALLIERI

**ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA EM RATOS EXPOSTOS CRONICAMENTE POR
VIA INALATÓRIA AO HERBICIDA ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D)**

Dissertação apresentada Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde. - Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientadora:
Profa. Dra. Renata Calciolari Rossi

Co-orientador:
Prof. Dr. Danillo Roberto Pereira

615.907
C377a

Cavallieri, Gabriela Vidotto.

Análise histopatológica em ratos expostos cronicamente por via inalatória ao herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) / Gabriela Vidotto Cavallieri. – Presidente Prudente, 2019.

31 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2019.

Bibliografia.

Orientador: Renata Calciolari Rossi

Co-orientador: Danillo Roberto Pereira

1. Toxicidade. 2. Contagem de Células Sanguíneas. 3. Mucosa Nasal. 4. Ratos. I. Título.

Catálogo: Bibliotecária - Jakeline Margaret de Queiroz Ortega – CRB 8/6246

GABRIELA VIDOTTO CAVALLIERI

**ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA EM RATOS EXPOSTOS CRONICAMENTE
POR VIA INALATÓRIA AO HERBICIDA ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO
(2,4-D)**

Dissertação apresentada Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde. Área de concentração: Ciências da Saúde.

Presidente Prudente, 22 de fevereiro de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a Renata Calciolari Rossi
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

Prof. Dr. Marcus Vinicius Pimenta Rodrigues
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

Prof^a Dr^a Susimary Aparecida Trevizan Padulla
Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” - UNESP
Presidente Prudente - SP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus e aos meus pais por serem essenciais em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, acima de tudo, a Deus, por permitir que eu pudesse realizar esse sonho, me capacitando e me abençoando e também por colocar anjos em minha vida, em forma de pessoas, durante toda minha trajetória até aqui. Minha fé foi essencial para que eu não desistisse em nenhum momento. Meu Deus, obrigada por os Teus planos para a minha vida serem sempre maiores do que os meus sonhos!

A minha amada orientadora Prof^a Dr^a Renata Calciolari Rossi, que me deu todo o suporte necessário, que sempre esteve disponível. Além de uma profissional exemplar é também uma pessoa de um coração gigante, que admiro imensamente. E agradeço ao Prof Dr. Marcus Vinicius Pimenta Rodrigues por ter me acolhido quando eu o procurei para demonstrar meu interesse em prestar o processo seletivo do Mestrado em Ciências da Saúde, por ter aceito participar da minha banca de defesa do mestrado e principalmente por ter me apresentado a minha orientadora.

Agradeço a minha mãe Regina por sempre torcer pelas minhas conquistas, por me acalmar nos momentos de desespero, por ser a pessoa que mais me admira e mais acredita no meu potencial. Deus foi muito generoso comigo por ter me dado você como mãe, palavras jamais serão suficientes para agradecer.

Ao meu pai Paulo Sérgio, que mesmo à distância, desde a graduação sempre me apoiou e me incentivou a continuar estudando. Sem dúvidas sem o seu apoio não poderia chegar onde cheguei.

Obrigada Paulo Henrique, meu noivo, por me apoiar e suportar meus momentos de estresse, por sonhar meus sonhos junto comigo, por acreditar em mim e por se orgulhar das minhas conquistas.

Gostaria de agradecer à Prof^a Dr^a Gisele Alborghetti Nai, primeiramente por dar todo o suporte durante a pesquisa e também por ter aceito participar da minha banca de qualificação. Também agradeço à Prof^a Dr^a Ana Paula Alves Favaretto por ter aceito fazer parte da minha banca de qualificação. Estendo meu agradecimento, ainda, à Prof^a Dr^a Susimary Aparecida Trevisan Padulla que aceitou participar da minha banca de defesa do mestrado. Me sinto muito honrada por poder contar com cada um de vocês

Agradeço às alunas Geovana Letícia Fernandes de Oliveira e Fabíola de Azevedo Mello por compartilhar os conhecimentos e colaborar durante toda a pesquisa, além de todos os outros alunos envolvidos na fase de experimentação. Também agradeço imensamente ao Prof Dr Edson Assunção Mareco por ter colaborado com as análises estatísticas.

Não poderia deixar de agradecer a todas as professoras do curso de Fonoaudiologia da Unoeste, em especial à Prof^a Dr^a Maria Cristina Alves Corazza e à Prof^a Me. Patrícia Arruda de Souza Alcarás, que desde a graduação me incentivaram a prosseguir os estudos, além de sempre oferecerem suporte a qualquer dificuldade que eu pudesse encontrar, por permitirem que eu realizasse o estágio de docência no curso de Fonoaudiologia e principalmente por confiarem em mim e no meu trabalho. São professoras e amigas que levarei para toda a vida como inspiração, para que eu seja sempre uma pessoa e profissional melhor.

Aos colegas que pude fazer no mestrado, conheci pessoas maravilhosas e admiráveis que espero continuar encontrando ao decorrer do meu caminho. Também agradeço a todos os professores do Mestrado em Ciências da Saúde pelas aulas ofertadas e por todo o suporte que ofereceram, saibam que cada aula me fez crescer um pouco mais como pessoa e profissional, vocês são todos incríveis.

Agradeço aos técnicos do laboratório de análises clínicas do hospital veterinário, do laboratório de anatomia patológica, do laboratório de pesquisa odontológica, do Biotério da Unoeste e também a funcionária Joyce Carvalho de Andrade (Secretária do MMADRE e do Ciências da Saúde) por sempre estar disponível para sanar nossas dúvidas.

Agradeço aos meus familiares e aos meus amigos que sempre torceram e rezaram por mim, mesmo muitos não entendendo o que era o Mestrado. São muitas pessoas para agradecer, espero não ter esquecido de ninguém, de qualquer forma agradeço imensamente a todos os que fizeram parte desse período na minha vida, que me ajudaram e apoiaram direta ou indiretamente, o meu muito obrigado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – (Brasil) CAPES – Código de Financiamento 001.

“Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois, o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar”. (Josué 1:9).

RESUMO

Análise histopatológica em ratos expostos cronicamente por via inalatória ao herbicida Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D)

Um dos meios mais utilizados para a aplicação dos defensivos agrícolas é a pulverização aérea, apesar dos riscos já conhecidos que essa técnica pode trazer, sobretudo devido à existência da deriva técnica. Os defensivos agrícolas podem causar intoxicações agudas, subagudas e crônicas. O herbicida Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), é um dos primeiros herbicidas formulados e um dos mais utilizados até hoje, no controle de várias plantas infestantes, em plantações de cereais, cana-de-açúcar, controle florestal e pomares. O objetivo do estudo foi avaliar histopatologicamente o epitélio nasal e o perfil hematológico de ratos submetidos à pulverização crônica do herbicida 2,4-D. Foram utilizados 40 ratos Wistar adultos machos, divididos em 4 grupos, sendo eles: Grupo Controle (GC), Grupo Baixa Concentração (GBC), Grupo Média Concentração (GMC) e Grupo Alta concentração (GAC). A exposição dos animais foi realizada de segunda a sexta, por meio de 2 caixas acopladas a nebulizadores, sendo uma caixa destinada ao grupo controle e a outra aos grupos expostos ao 2,4-D, os quais eram responsáveis por pulverizar as diferentes concentrações do herbicida por um tempo de 15 minutos diários, durante 6 meses consecutivos. Após o período de exposição, foi feita a coleta de amostra de sangue para confecção do hemograma e coleta e análise do epitélio nasal por meio da quantificação dos mastócitos e infiltrado inflamatório. Foi observado que houve diferença estatisticamente significativa apenas no parâmetro hematológico Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) do GBC quando comparado ao GC, porém o GBC estava com valores de CHCM dentro dos valores de referência e o GC estava elevado. Em relação aos outros parâmetros hematológicos, a quantificação dos mastócitos e do infiltrado inflamatório, não houve diferença estatisticamente significativa de nenhum grupo exposto ao herbicida 2,4-D comparados ao GC. Sendo assim, o herbicida 2,4-D não demonstrou toxicidade aos parâmetros hematológicos e epitélio nasal de ratos Wistar após exposição crônica inalatória no período de 6 meses, comparados ao grupo controle, em concordância com a classificação toxicológica do herbicida publicada Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA). Cabe ressaltar que os efeitos tóxicos precisam ser avaliados com pesquisas em períodos de tempo maiores ao realizado pelo presente trabalho.

Palavras-chave: Toxicidade. Contagem de Células Sanguíneas. Mucosa Nasal. Ratos.

ABSTRACT

Histopathological analysis in rats chronically exposed by inhalation to the herbicide 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)

One of the most used means for the application of pesticides is aerial spraying, despite the already known risks that this technique can bring, mainly due to the existence of technical drift. Agricultural pesticides can cause acute, subacute and chronic intoxications. The herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) is one of the first herbicides formulated and one of the most used to date, in the control of several weed plants, in cereal plantations, sugarcane plantations, forest control and orchards. The objective of the study was to evaluate nasopharyngeal epithelium and the hematological profile of rats submitted to chronic spraying of 2,4-D herbicide. Forty male Wistar rats were divided into four groups: Control Group (GC), Low Concentration Group (GBC), Medium Concentration Group (GMC) and High Concentration Group (GAC). The animals were exposed from Monday to Friday, through 2 boxes attached to nebulizers, one box for the control group and the other for groups exposed to 2,4-D, which were responsible for spraying the different concentrations of herbicide for a period of 15 minutes daily for 6 consecutive months. After the exposure period, the blood sample was collected for the hemogram and the nasal epithelium was collected and analyzed by quantification of the mast cells and inflammatory infiltrate. It was observed that there was a statistically significant difference only in the haematological parameter Average Corpuscular Hemoglobin Concentration (CHCM) of the GBC when compared to the GC, but the GBC was with CHCM values within the reference values and the GC was high. Regarding the other hematological parameters, quantification of the mast cells and the inflammatory infiltrate, there was no statistically significant difference of any group exposed to the 2,4-D herbicide compared to the CG. Therefore, 2,4-D herbicide did not demonstrate toxicity to the haematological parameters and nasal epithelium of Wistar rats after chronic inhalation exposure in the 6-month period, compared to the control group, in agreement with the toxicological classification of the herbicide published Agency of Environmental Protection of the United States (EPA). It should be noted that the toxic effects need to be evaluated with research in longer periods of time than the present study.

Key words: Toxicity. Blood Cell Count. Nasal Mucosa. Rats

LISTA DE SIGLAS

ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CHCM	- Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
GACI	- Grupo Alta Concentração Inalatório
GBCI	- Grupo Baixa Concentração Inalatório
GCI	- Grupo Controle Inalatório
GMCI	- Grupo Média Concentração Inalatório
HCM	- Hemoglobina Corpuscular Média
IBAMA	- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IBGE	- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
PLS	- Projeto de Lei do Senado
TON/IA	- Tonelada por Ingrediente Ativo
VCM	- Volume Corpuscular Médio

SUMÁRIO

Manuscrito: “A exposição crônica inalatória ao herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) não demonstra toxicidade aos parâmetros hematológicos e epitélio nasal de ratos”	12
Introdução	15
Métodos	16
Resultados	18
Discussão	20
Referências	24
ANEXOS	26
ANEXO A - PARECER FINAL	27
ANEXO B - NORMAS PARA PUBLICAÇÃO DA REVISTA	28

Manuscrito: Análise histopatológica em ratos expostos cronicamente por via inalatória ao herbicida Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D)

Periódico selecionado para provável submissão:

Environmental Health Perspectives

O escopo da revista Environmental Health Perspectives inclui todas as disciplinas estabelecidas e emergentes que examinam a relação entre o meio ambiente e a saúde humana. São publicados artigos originais das áreas de toxicologia experimental, epidemiologia, ciência da exposição e avaliação de risco. O fator de impacto atual é de 8.44 e Qualis Capes na área de Medicina II é A1.

Link de acesso: (<https://ehp.niehs.nih.gov/about-ehp>).

Folha de rosto

Título: Análise histopatológica em ratos expostos cronicamente por via inalatória ao herbicida Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D)

Title: Histopathological analysis in rats chronically exposed by inhalation to the herbicide 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)

Autores: Gabriela Vidotto Cavallieri¹, Geovana Letícia Fernandes de Oliveira², Gisele Alborghetti Nai^{1,3}, Edson Assunção Mareco^{2,4}, Renata Calciolari Rossi^{1,2,3,4}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Oeste Paulista, Rodovia Raposo Tavares, km 572 - Bairro Limoeiro - Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

²Faculdade de Fisioterapia, Universidade do Oeste Paulista, Rua José Bongiovani, 700 – Cidade Universitária - Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

³Faculdade de Medicina, Universidade do Oeste Paulista, Rua José Bongiovani, 700 – Cidade Universitária - Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

⁴Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional, Universidade do Oeste Paulista, Rodovia Raposo Tavares, km 572 - Bairro Limoeiro Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

Artigo Original

Autor correspondente:

Renata Calciolari Rossi

Endereço: Km 572, SP-270 - Bairro Limoeiro, Pres. Prudente - SP, 19026-310 - São Paulo, Brasil. Tel: +55 (18) 3229-2025

E-mail: renatacalciolari@terra.com.br

Conflito de interesse: Os autores relatam não haver conflitos de interesse.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Agradecemos à Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE) pelo auxílio para a realização desta pesquisa. Aos técnicos do Biotério e do laboratório de análises clínicas do hospital veterinário da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE) pelo serviço prestado e por todo o suporte durante a realização do trabalho.

Resumo

Introdução: O Brasil é um dos maiores consumidores de defensivos agrícolas do mundo, ultrapassando a marca de vendas do mercado global, cenário que perdura por mais de 10 anos. Dentre os agrotóxicos utilizados no Brasil, o herbicida Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) foi um dos primeiros herbicidas formulados e registrados no Brasil e um dos mais utilizados até hoje, no controle de várias plantas infestantes, em plantações de cereais, cana-de-açúcar, controle florestal e pomares. Essa expansão do consumo do 2,4-D traz preocupações em relação ao meio ambiente e principalmente a saúde humana, pois a exposição a esse agente químico poderá gerar efeitos nocivos ao sistema respiratório, hematológico, neurológicos, renais, entre outros. **Objetivos:** avaliar histopatologicamente o epitélio nasal e o perfil hematológico de ratos submetidos à pulverização crônica por via inalatória do herbicida 2,4-D. **Métodos:** Foram utilizados 40 ratos Wistar adultos machos, divididos em 4 grupos, sendo eles: Grupo Controle (GC), Grupo Baixa Concentração (GBC), Grupo Média Concentração (GMC) e Grupo Alta concentração (GAC). O Protocolo de exposição foi realizado através de 2 caixas ligadas a 2 dois nebulizadores ultrassônicos, que realizaram a pulverização diária do herbicida por 15 minutos, durante 6 meses. Após o período de exposição, foi feita a coleta de amostra de sangue para confecção do hemograma e coleta e análise do epitélio nasal para quantificação dos mastócitos e infiltrado inflamatório. **Resultados:** Houve diferença estatisticamente significativa em relação aos valores de Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) do GBC quando comparado ao GC, porém o GC estava com valores elevados e o GBC estava com valores dentro dos padrões de normalidade. Em relação aos outros parâmetros hematológicos avaliados, os mastócitos e o infiltrado inflamatório não foram observados diferença estatisticamente significativa dos grupos expostos ao herbicida 2,4-D quando comparados ao GC. **Discussão:** Os resultados encontrados referentes aos valores de CHCM não foram esclarecedores, pois o CHCM não apresentou diferença estatisticamente significativa dos grupos em relação ao GC, o que não deixou claro se houve influência da exposição ao herbicida no resultado desse componente. O mesmo ocorreu com os valores de VCM, que foi reduzida em todos os animais do presente estudo, sem diferença estatística dos grupos comparados ao GC. Devido a mucosa nasal ser a porta de entrada do sistema respiratório é esperado que após a exposição inalatória a substâncias como o herbicida 2,4-D sejam manifestados sintomas de inflamação e/ou alérgicos no epitélio nasal, entretanto não foi o que ocorreu. Sendo assim, o herbicida 2,4-D não demonstrou toxicidade aos parâmetros hematológicos e epitélio nasal de ratos Wistar após exposição crônica inalatória no período de 6 meses quando comparados ao grupo controle, em consonância com a classificação toxicológica da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (EPA).

Palavras-chave: Toxicidade. Contagem de Células Sanguíneas. Mucosa Nasal. Ratos

Introdução

O Brasil está entre os países que são considerados os maiores produtores agropecuários, além de ser o segundo que mais exporta agroquímico, no qual apresenta fundamental importância na economia local (Pignati et al. 2017). Além disso, o país se tornou campeão em vendas de defensivos agrícolas no ranking mundial desde o ano de 2008, quando movimentou cerca de R\$ 7 bilhões no mercado de agrotóxicos, o qual ultrapassou mais que o dobro do crescimento do mercado global expandindo seu mercado em 190% (Londres 2011).

Dentre os diversos defensivos agrícolas comercializados e disseminados no Brasil, está o herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), o qual vem sendo utilizado no controle de várias plantas que interferem negativamente na agricultura, em plantações de cereais, cana-de-açúcar, controle florestal e pomares. O 2,4-D pertence à classe dos ácidos fenoxiacéticos, foi o primeiro a ser introduzido no Brasil, é o mais utilizado no mundo, e continua sendo um dos defensivos agrícolas mais estudados, tanto em animais quanto em humanos, principalmente pelo fato de que os mecanismos exatos relacionados aos efeitos tóxicos do 2,4-D não estão esclarecidos (Dakhkhni et al. 2016).

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (EPA) (2005) classifica o 2,4-D como categoria de toxicidade III ou IV por exposição via oral, dérmica e inalatória. Além disso, revelam que o herbicida não é um irritante da pele (Categoria de Toxicidade III ou IV) e embora as formas de éster de 2,4-D não sejam irritantes para os olhos (Categoria de toxicidade III ou IV), as formas ácidas e salinas são consideradas irritantes oculares graves (Categoria de toxicidade I).

Estudiosos evidenciaram que o 2,4-D é solúvel em água e distribui-se amplamente por todo o corpo sem acumulação preferencial em qualquer órgão específico. Da mesma forma, não há evidências de que o 2,4-D em qualquer de suas formas ative ou transforme o sistema imunológico mesmo após exposição prolongada a altas doses (Almosny e Monteiro 2007).

Estudos anteriores já demonstraram que a exposição oral ao 2,4 pode causar alterações no perfil hematológico e no sistema respiratório, tanto em animais quanto em humanos, por meio da presença de rinite e alterações dos níveis de hemoglobina no sangue (Slager et al. 2009. Slager et al. 2010. Wafa et al. 2017).

Portanto, pesquisas sobre quais são os efeitos da exposição crônica ao 2,4-D nas células sanguíneas e no sistema respiratório são de grande relevância devido a utilidade dos dados na compreensão dos efeitos do herbicida no organismo humano, principalmente

para trazer evidências de como a exposição inalatória ao herbicida pode afetar o sistema respiratório superior, já que a maioria dos estudos investigam o trato respiratório inferior.

Sendo assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar histopatologicamente os parâmetros hematológicos e o epitélio nasal de ratos submetidos à exposição crônica inalatória ao herbicida 2,4-D.

Métodos

Aspectos da natureza ética

O estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE) sob o n° 4099 e foi realizado de acordo com o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório do Instituto Nacional de Saúde (USA).

Animais e ambiente de experimentação

Para a realização do experimento, foram utilizados 40 ratos Wistar adultos machos (400g), alocados em gaiolas plásticas individuais, medindo 30x16x19 centímetros, a temperatura média de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, com ciclos de 12 horas de luminosidade, sendo das 07:00 às 19:00 horas (período claro) e 19:00 às 07:00 horas (período escuro). Os animais receberam dieta padrão para animais de laboratório (Supralab®, Alisul, Brasil) e água *ad libitum*.

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos, sendo 10 animais em cada grupo, de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1. Divisão dos grupos e os valores das concentrações do 2,4-D.

Grupo Experimental	Sigla	Concentração de Exposição ao 2,4-D*
Controle	GC	0 (10 ml de água destilada)
Baixa Concentração	GBC	$3,71 \times 10^{-3}$
Média Concentração	GMC	$6,17 \times 10^{-3}$
Alta Concentração	GAC	$9,28 \times 10^{-3}$

*Em grama de ingrediente ativo/hectare (g.i.a/ha), considerando experimento ambientalmente relevante segundo forma de aplicação do produto.

Todas as concentrações do 2,4-D foram diluídas em 10 ml de água destilada. O tempo de exposição ao herbicida foi de 15 minutos diários para cada grupo, nebulizados em 5 dias consecutivos da semana (segunda à sexta) a fim de simular a exposição ocupacional.

As concentrações utilizadas foram baseadas na recomendação do fabricante para uso agrícola, especificado na bula, do 2,4-D ® (Formulação comercial, 67,0% m/v, Nortox, Paraná, Brasil) de acordo com as medidas das caixas em que os animais permaneciam durante a exposição, mimetizando o volume do ambiente, sendo feitos ajustes para a caixa baseado na exposição ambiental.

O protocolo de experimentação contou com duas caixas (32x 24x 32 cm) cada uma ligada a um nebulizador ultrassônico da marca Pulmosonic Star®. Uma caixa foi destinada aos animais do GC e a outra caixa aos animais do GBC, GMC e GAC. Os 10 animais de cada grupo eram nebulizados juntos, na ordem da menor concentração para a maior.

Todos os animais foram expostos durante 6 meses e após este período foram eutanasiados. A anestesia e eutanásia foram realizadas com Tiopental sódico (Syntec, EUA), nas doses de 100 mg/Kg de peso, administrado na cavidade peritoneal. Os indicativos de morte foram a ausência de movimentos respiratórios, batimentos cardíacos e perda dos reflexos.

Foi coletado 2 ml de sangue de cada animal, por meio de punção intracardíaca, para a confecção do hemograma. O analisador hematológico modelo POCH-100iV DIFF (Sysmex do Brasil Indústria e Comércio LTDA®, Curitiba/PR-Brasil) foi utilizado para analisar as plaquetas, as séries vermelha e branca.

Após a eutanásia dos animais, o focinho de cada rato foi retirado para a realização da análise histológica. Os focinhos foram fixados em formaldeído a 10% e em seguida emblocados em parafina. Os blocos foram cortados em micrótomo eletrônico na espessura de 5µm e corados por Hematoxilina-Eosina (HE) para a quantificação dos leucócitos totais, onde as células coram-se de roxo e o citoplasma em rosa. Para a quantificação dos mastócitos, foi utilizada a coloração de Azul de toluidina, corando as células na cor azul.

Após a confecção das lâminas, foram capturadas imagens em microscópio com câmera acoplada (Leica ICC50 HD) para analisa-las morfometricamente. Foi utilizado o software Image-Pro Plus® (Versão 7.0, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) para quantificar os mastócitos e o infiltrado inflamatório que estavam na lâmina própria, em toda extensão do corte.

As lâminas contendo os cortes histológicos foram cegadas para que os examinadores não soubessem o grupo analisado e, desta forma, emitissem falsos resultados.

Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise de distribuição normal por meio do teste de Shapiro-Wilk disponível no programa R (versão 3.2.3). Como os dados não apresentaram uma distribuição normal, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn, para análise da diferença entre os grupos. Foram considerados significativos os valores que apresentaram $p < 0,05$.

Resultados

Não houve morte de nenhum animal durante o período experimental de exposição crônica inalatória ao herbicida 2,4-D até a data da eutanásia, demonstrando que as concentrações utilizadas durante o tempo de exposição ao herbicida não tiveram efeito letal.

Entre todos os aspectos avaliados, tanto para os parâmetros hematológicos, quanto para a quantificação dos mastócitos e infiltrado inflamatório, a única diferença estatisticamente significativa encontrada em comparação ao GC foi em relação aos valores de Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) do GBC, entretanto o GC estava com valores de CHCM acima dos valores de referência e o GBC estava com valores dentro dos padrões de normalidade (Tabela 2), o que não deixou claro se houve influência da exposição ao herbicida no resultado desse parâmetro.

A microcitose, caracterizada pela redução dos valores de VCM, foi encontrada em todos os animais do presente estudo, sendo mais acentuada no GAC quando comparada ao GMC, porém não houve diferença dos grupos ao compará-los com o GC, demonstrando que a exposição crônica inalatória ao 2,4-D não foi a responsável pela microcitose existente.

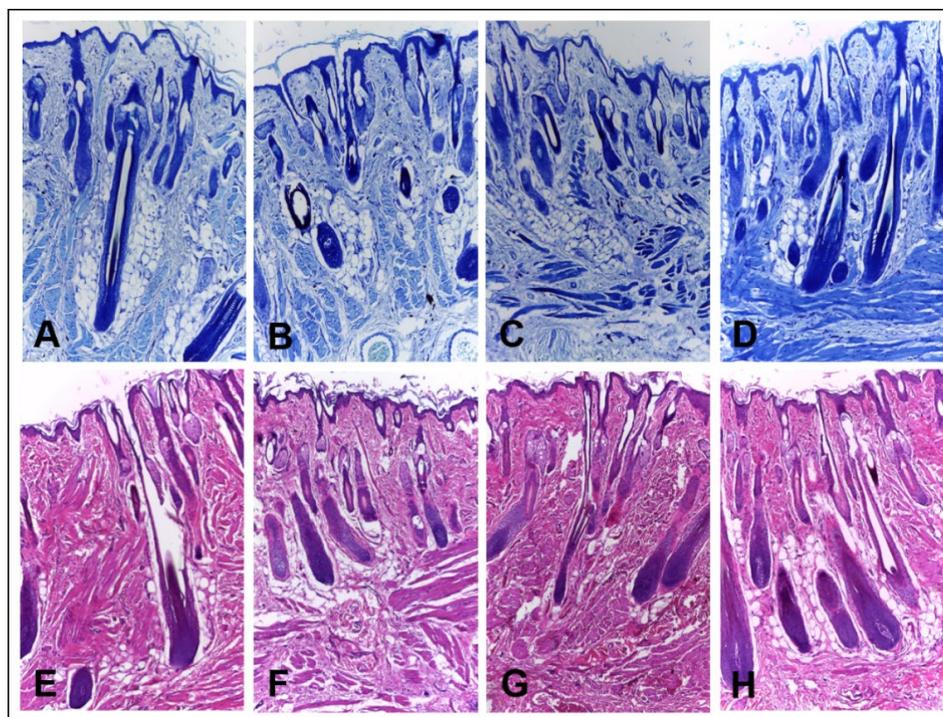
Tabela 2 Parâmetros hematológicos, quantificação dos mastócitos e infiltrado inflamatório comparados entre os grupos de estudo.

Parâmetros Hematológicos	Valores de referências	GC	GBC	GMC	GAC	Valor de p
Eritrócitos (X10 ⁶ /mm ³)	6,5 – 7,9	9,5 (9,2-9,7)	10,1 (9,8-10,3)	9,6 (9,4-9,9)	10 (10-10,1)	0,1431
Hemoglobina (g/dl)	14,2 – 15,9	17,5 (17-17,8)	17,8 (17,6-18)	18,1 (16,8-18,1)	18,2 (17,8-18,5)	0,297
Hematócrito (%)	44 – 49	50,9 (50,6-52,1)	54,4 (52,8-55,1)	53,7 (50,1-55,2)	52,8 (52-53,6)	0,2244
HCM (pg)	19,8 – 21,9	18,4 (18,3-18,7)	17,6 (17,6-17,8)	18,2 (18 -18,4)	18,3 (18,2– 18,4)	0,0622
CHCM (%)	31,5 - 33,6	34,2 ^{ab} (33,6-34,4)	32,7 ^c (32,7-33,2)	33,0 ^{bc} (33,0-33,3)	34,3 ^a (34,2-34,3)	0,0003*
VCM (fl)	60,2 – 69,2	53,9 ^{ab} (53,7-54,5)	53,7 ^{ab} (53,6-54)	54,7 ^a (54,4-55,2)	53,1 ^b (52,9-53,6)	0,0117*
Proteína plasmática total (g/dl)	6,1 – 7,1	8,2 (7,8-8,4)	8 (8-8)	7,7 (7,6-7,8)	8 (7,8-8)	0,297
Fibrinogênio (mg/dl)	100-300	200 (200-200)	400 (200-400)	200 (200-200)	200 (200-400)	0,0708
Plaquetas (x10 ³ /mm ³)	837-1455	1189 (1131-1385)	1283,5 (1185-1312)	1313,5 (1295-1347)	1111,5 (939-1237)	0,394
Leucócitos Totais- valores absolutos (mm ³)	3,1 - 9,7	3,5 (3,1-4,9)	3,9 (3,9-4,3)	5,4 (4,9-5,5)	4,9 (4,7-5,4)	0,2063
Neutrófilos (mm ³)	93-3104	1495,5 (1053-1764)	1537,5 (1419-2088)	2286,5 (2058-2365)	1550 (1485-1728)	0,6216
Eosinófilos - valores absolutos (mm ³)	0 – 194	75 (64-102)	83,5 (80-102)	93 (93-196)	122,5 (84-162)	0,6216
Linfócitos - valores absolutos (mm ³)	1953-9021	2032 (1911-2550)	1792,5 (1482-2448)	2832,5 (2352-3339)	3012,5 (2914-3078)	0,121
Monócitos (mm ³)	0-776	165,5 (98-184)	197,5 (195-258)	198,5 (175-294)	250,5 (235-294)	0,1418
Mastócitos/área	-	0,000050271 ^{ab} (0,000026540-0,000060309)	0,000041577 ^a (0,000031267-0,000043931)	0,000047709 ^a (0,000046686-0,000068626)	0,000062081 ^{bc} (0,000062426-0,000061736)	0,010*
Infiltrado inflamatório/área	-	0,000519578 (0,000460610-0,000584180)	0,000544370 (0,00057865-0,00059895)	0,000646978 (0,000375495-0,000718188)	0,000569992 (0,000557731-0,000584180)	0,4523

Nota: HCM, hemoglobina corpuscular média. CHCM, concentração de hemoglobina corpuscular média. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Resultados apresentados em mediana (Intervalo Interquartil)

Valor de p obtido pelo Teste de Kruskal Wallis e pós-teste de Dunn para comparação de todos os grupos. Nível de significância de $p < 0,05$.

Figura 1. Cortes histológicos do epitélio nasal dos ratos expostos à água destilada e ao herbicida 2,4-D.



Legenda: Cortes histológicos do epitélio nasal dos ratos. Em A, B, C e D: epitélio nasal com coloração azul de toluidina para quantificação dos mastócitos (10x) do GC, GBC, GMC e GAC, respectivamente. Em E, F, G e H: epitélio nasal com coloração hematoxilina eosina para quantificação do infiltrado inflamatório (10x) do GC, GBC, GMC e GAC, respectivamente.

Discussão

O aumento do CHCM pode ser causado por diversos fatores como: amostras hemolisadas ou lipêmicas, aglutinação de eritrócitos, esferocitose hereditária e osmolalidade anormal (sódio baixo) (Rosenfeld 2012). Outros autores observaram que após a exposição à pesticidas organofosforados houve diminuição dos valores de CHCM e não aumento, como observado no GAC e GC na presente pesquisa (Fareed et al. 2013).

Resultados semelhantes ao presente trabalho foram encontrados em um estudo que avaliou a exposição crônica oral ao 2,4-D em cães. A exposição foi realizada durante 52 semanas, para 4 grupos, sendo eles expostos as seguintes doses de 2,4-D misturadas na dieta diária dos animais: 0, 1, 5 e 7.5 mg/kg/dia. Os pesquisadores observaram que nenhum grupo apresentou alterações significativas em relação aos parâmetros hematológicos estudados (leucócitos totais, eritrócitos, hematócrito, hemoglobina, plaquetas, CHCM, VCM e HCM) (Charles et al. 1996a), sugerindo que as alterações encontradas nos valores de CHCM e VCM

na presente pesquisa não foi devido a exposição inalatória ao 2,4-D, visto que o estudo anterior apresentou tempo de exposição maior, comparado ao do presente trabalho, e não observou diferença nesses parâmetros.

Entretanto resultados controversos foram encontrados em um estudo com a exposição subcrônica oral (13 semanas) ao 2,4-D nas formas de ácido, amina e éster, misturados também na ração dos ratos, porém com doses maiores ao trabalho anterior: 0, 1, 15, 100 e 300 mg/kg/dia. Os resultados do estudo demonstraram que a maior dose de 2,4-D (300 mg/kg) causou a redução dos níveis de hemoglobina, plaquetas e leucócitos totais com diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo controle nas três formas de 2,4-D (Charles et al. 1996b). Provavelmente a diferença entre os resultados dos estudos está relacionada as doses utilizadas, sendo que a dose de 300 mg/kg é considerada acima do estabelecido, que para a exposição subcrônica é de 15 mg/kg/dia (EPA, 2005).

Wafa et al. (2017) também observaram que a exposição subaguda oral (4 semanas) em doses média e alta ao 2,4-D causou diminuição dos níveis de hemoglobina no sangue de ratos, comparado ao grupo controle. Esses autores avaliaram 4 grupos, expostos, respectivamente, a 1 ml de água destilada, 15, 75 e 150 mg/kg de 2,4-D, porém, diferente dos estudos citados anteriormente, o 2,4-D foi diluído na água que os ratos ingeriam diariamente e não na dieta.

A principal diferença encontrada entre os estudos citados e a presente pesquisa está no tipo de exposição, sendo inalatória e oral, com isso os resultados sugerem que a exposição oral ao herbicida, quando administrado diretamente no alimento ou na água em doses maiores que as estabelecidas pela EPA (2005) podem ser mais agressivas aos parâmetros hematológicos comparada a exposição inalatória.

Geralmente a mucosa nasal é a primeira a sofrer lesões por substâncias tóxicas inaladas, sendo um alvo potencial para contaminantes presentes no ar (Yorgancilar, Deveci e Deveci 2012). Entretanto, essa relação não foi observada na presente pesquisa, visto que a exposição inalatória ao 2,4-D em um período de 6 meses não causou inflamação da mucosa nasal e aumento dos mastócitos comparado ao grupo controle.

Os mesmos resultados foram encontrados em relação ao infiltrado inflamatório/área em um estudo com exposição aguda ao 2,4-D em camundongos nos períodos de 24, 48, 72 e 192 horas. Ainda na mesma pesquisa não foram encontradas diferenças da quantificação dos mastócitos dos grupos expostos ao 2,4-D comparados ao grupo controle, única diferença encontrada para o grupo de alta concentração no intervalo de tempo de 48 horas, comparado ao de 24 horas, porém sem diferença quando comparado ao

grupo exposto a 192 horas, demonstrando que o aumento dos mastócitos pode estar relacionado a dose de exposição, e não ao tempo (Mello et al. 2018).

Uma revisão de literatura, realizada por Ye et al. (2017), que avaliou a associação entre a exposição a pesticidas e a saúde respiratória na população geral demonstrou que as exposições a defensivos agrícolas organofosforados, inseticidas piretróides e pesticidas organoclorados foram associadas à função pulmonar prejudicada, porém a exposição ao herbicida 2,4-D não apresentou nenhuma associação prejudicial à saúde respiratória, sugerindo que em doses ambientalmente relevantes o herbicida não é tóxico ao sistema respiratório inferior, o que poderia justificar os achados da presente pesquisa.

No estudo de Slager et al. (2009), o glifosato e o 2,4-D foram os herbicidas mais correlacionados a rinite, associado apenas ao uso atual de ambos, e não ao uso pregresso. Porém, esses autores avaliaram a presença de rinite apenas pelos sintomas relatados pelos trabalhadores e não por testes específicos. A rinite pode ser resultado de um resfriado ou de uma doença como a asma, o que não foi considerado no estudo. Pensando nisso, outra pesquisa realizada pelos mesmo autores, ao excluir os trabalhadores com sintomas de rinite que apresentaram episódios de resfriado e/ou asma anteriormente, demonstrou que o 2,4-D não apresentou associação significativa com a presença de rinite (Slager et al. 2010).

Embora não encontramos diferença em relação a quantificação de mastócitos entre o grupo controle e os grupos expostos ao 2,4-D no presente trabalho, não podemos descartar a hipótese da associação da exposição inalatória ao 2,4-D com a presença de rinite, visto que não avaliamos os níveis de imunoglobulina E (IgE), que é o desencadeante da resposta inflamatória na rinite, sendo considerado uma limitação do nosso estudo.

Não foram encontrados na literatura dados sobre a influência da exposição inalatória crônica ao herbicida 2,4-D nos parâmetros hematológicos e sistema respiratório, somado a isso os resultados encontrados demonstram a necessidade de se ampliar as pesquisas sobre a exposição crônica, principalmente, para poder esclarecer os efeitos nocivos dos defensivos agrícolas.

A partir dos resultados obtidos podemos concluir que o herbicida 2,4-D não demonstrou toxicidade aos parâmetros hematológicos e epitélio nasal de ratos Wistar após exposição crônica inalatória, no período de 6 meses, quando comparados ao grupo controle, em concentrações equivalentes às aplicadas no uso agrícola, o que corrobora com a classificação toxicológica do 2,4-D, para exposição inalatória, realizada pela EPA (2005). Além disso, foi possível observar que os efeitos do herbicida não estão associados a

concentração exposta. O que não descarta a possibilidade de causar alterações hematológicas e respiratórias se expostos em um período de tempo maior que 6 meses.

Referências

Almosny NRP, Monteiro AM. 2007. Patologia clínica. In: Cubas ZS, Silva JCS, Catão-Dias JL (Eds) Tratado de Animais Selvagens: medicina veterinária, 1st edn., São Paulo, SP, Brasil, Roca, pp. 939-966.

Charles JM, Cunny HC, Wilson RD, Bus JS. 1996b. Comparative Subchronic Studies on 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid, Amine, and Ester in Rats. *Toxicological Sciences* 33(2):161–165, PMID: 8921334, <https://doi.org/10.1093/toxsci/33.2.161>.

Charles JM, Dalgard DW, Cunny HC, Wilson RD, Bus JS. 1996a. Comparative subchronic and chronic dietary toxicity studies on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, amine, and ester in the dog. *Fundam Appl Toxicol* 29(1):78-85, PMID: 8838642, <https://doi.org/10.1093/toxsci/29.1.78>.

Dakhakhni TH, Raouf GA, Qusti SY. 2016. Evaluation of the toxic effect of the herbicide 2, 4-D on rat hepatocytes: an FT-IR spectroscopic study. *Eur Biophys J* 45(4): 311-20, PMID: 26631110, <https://doi.org/10.1007/s00249-015-1097-7>.

Fareed M, Pathak MK, Bihari V, Kamal R, Srivastava AK, Kevasachandran CN. 2013. Adverse respiratory health and hematological alterations among agricultural workers occupationally exposed to organophosphate pesticides: a cross-sectional study in North India. *PLoS One* 8(7):e69755, PMID: 23736093, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0069755>.

Londres F. 2011. Agrotóxicos no Brasil: Um guia para ação em defesa da vida. Rio de Janeiro, RJ, Brasil: AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa.

Mello FA, Quinallia G, Marion AC, Jorge FC, Marinelli LM, Salge AKM, Fagiani MAB, Mareco EA, Favareto APA, Rossi e Silva RC. 2018. Avaliação da cavidade nasal de camundongos submetidos à exposição ao herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético. *Med* 51(4):247-53, <http://dx.doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v51i4p247-253>.

Pignati WA, Lima FANS, Lara SS, Correa MLM, Barbosa JR, Leão LHC, Pignati MG. 2017. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. *Ciênc Saúde Colet* 22(10):3281-93, PMID: 29069184, <http://dx.doi.org/10.1590/1413-812320172210.17742017>.

Rosenfeld R. 2012. Hemograma. *J Bras Patol Med Lab* 48(2):244, <http://dx.doi.org/10.1590/S1676-24442012000400001>.

Slager RE, Poole JA, Levan TD, Sandler DP, Alavanja MC, Hoppin JA. 2009. Rhinitis associated with pesticide exposure among commercial pesticide applicators in the agricultural health study. *Occup Environ Med* 66(11):718-24, PMID: 19289390, <https://doi.org/10.1136/oem.2008.041798>.

Slager RE, Simpson SL, Levan TD, Poole JA, Sandler DP, Hoppin JA. 2010. Rhinitis associated with pesticide use among private pesticide applicators in the agricultural health study. *J Toxicol Environ Health A* 73(20):1382-93, PMID: 20818537, <https://doi.org/10.1080/15287394.2010.497443>.

U.S. United States Environmental Protection Agency (EPA). 2,4 RED facts. 2005, https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/fs_PC-030001_30-Jun-05.pdf [acessado 2019 mar. 10].

Wafa T, Amel N, Issam C, Imed C, Abdelhedi M, Mohamed H. 2017. Subacute effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic herbicide on antioxidant defense system and lipid peroxidation in rat erythrocytes. *Pestic Biochem Physiol* 99(3):256-64, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.01.004>.

Ye M, Beach J, Martin JW, Senthilselvan A. 2017. Pesticide exposures and respiratory health in general populations. *J Environ Sci (China)*, 51:361-70, PMID: 28115149, <https://doi:10.1016/j.jes.2016.11.012>.

Yorgancilar E, Deveci E, Deveci S. 2012. Effects of Formaldehyde on Respiratory Mucosa in Rats. *Int J Morphol* 30(2):521-23, <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022012000200026>.

ANEXOS

ANEXO A

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PPG - Programa de Pesquisa de Pós-Graduação
PEIC - Programa Especial de Iniciação Científica

Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO EPITÉLIO NASAL E COMPONENTES DO SANGUE EM RATOS EXPOSTOS CRONICAMENTE AO HERBICIDA ÁCIDO DICLOROFENÓXIACÉTICO (2,4-D)", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 4099 e tendo como participante(s) GABRIELA VIDOTTO CAVALIERI (discente), GEOVANA LETICIA FERNANDES DE OLIVEIRA (discente), DANILLO ROBERTO PEREIRA (docente), RENATA CALCIOLARI ROSSI E SILVA (orientador responsável), foi avaliado e APROVADO pelo COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPD) e COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

Este Projeto de Pesquisa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de Julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido APROVADO em reunião realizada em 06/09/2017.

Vigência do projeto: 08/2017 a 02/2019.

Espécie/Linhagem	Nº de Animais	Peso	Idade	Sexo	Origem
Ratos Wistar	20	400 gramas	60 dias	M	Biotério central da UNOESTE
Ratos Wistar	20	400 gramas	60 dias	F	Biotério central da UNOESTE

Presidente Prudente, 27 de Setembro de 2017.

Prof. D. Clair Rodrigues Garcia Jr.
Coordenador Científico da CPDI

Profª Ms. Adriana Falcão de Brito
Coordenadora da CEUA - UNOESTE

ANEXO B

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO - REVISTA ENVIRONMENTAL HEALTH PERSPECTIVES

Link para acesso: <https://ehp.niehs.nih.gov/authors/research-articles>

RESEARCH ARTICLES

Research articles report original research results that are relevant to the relationship between the environment and human health, and that make a substantial advance in the field. For research articles involving animal subjects, authors must adhere to the ARRIVE (Animals in Research: Reporting *in Vivo* Experiments) guidelines for reporting animal research (Kilkenny et al. 2010; Tilson and Schroeder 2013). For observational research studies, *EHP* strongly recommends that authors consult an appropriate version of the STROBE (Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology) guidelines.

Suggested Length

Suggested length is < 7,000 words, excluding the text in the abstract, references, tables, figure legends, acknowledgments, and Supplemental Material.

Title

The title should consist of ≤ 300 characters and should state the subject of the paper and include relevant information to help potential readers determine whether the paper might be related to their interests or needs. Relevant information includes the exposure(s) and outcome(s) assessed, and whether the study was observational or experimental. For epidemiological studies, consider key characteristics of the study population (e.g., gender, age, location, cohort) and design. For experimental studies, indicate the experimental model, including species or *in vitro* system(s). The title should not be a declarative statement of the study results or conclusions.

Abstract

Include a structured abstract of ≤ 300 words using the following headings: Background, Objectives, Methods, Results, Discussion.

The abstract should not include references or any information that does not appear in the text of the manuscript. We recommend that authors indicate study names or sources of data that are integral to the study. Summarize major findings in a balanced manner, rather than focusing only on findings that support the study hypothesis.

Main Text Structure

Sections should appear in the following order:

- Introduction
- Methods

- Results
- Discussion
- References
- Tables
- Figure legends

Concise subheadings (≤ 8 words each) may be used to designate major topics within each of these sections. Subheadings should be used to organize information, but should not summarize or interpret results or conclusions. Do not exceed three levels of headings, including the main headers.

Introduction

Provide background information to support the motivation for the study, and state the study objectives or hypotheses. Specifically,

- Provide context for the study, including information on the exposures and outcomes and why they are relevant to environmental health.
- Briefly review the literature to summarize current knowledge.
 - Indicate whether the research was observational or experimental, and note key characteristics of study populations or experimental models.
 - Present a balanced review of the literature, and acknowledge inconsistencies, rather than noting only findings that support the present study hypothesis.
- Identify knowledge gaps addressed by the current study.
- Provide a clear description of the study questions/hypotheses, aims, or objectives, and, if appropriate, an overview of the approach used to address them.

Do not summarize study results or conclusions in the Introduction.

Methods

EHP requires complete methodological transparency—describe methods in enough detail to ensure that the study could be repeated by other researchers in the same field (at least in theory), and that it can be understood and interpreted by most *EHP* readers. Specifically,

- Thoroughly describe the methods used to generate all results reported in the manuscript, including (as appropriate):
 - Study design and population or experimental model
 - Methods to measure or estimate exposures
 - Outcome definitions and ascertainment or measurement
 - Assay methods and conditions
 - Justification of exposure and/or doses
 - Number of biological and/or technical replicates
 - Statistical analyses
 - Accession numbers (or “rs” numbers for SNPs)
 - Sensitivity and secondary analyses
 - All criteria used to interpret results
 - Key assumptions and limitations of the methods
 - Model numbers of all equipment used
 - Company name, catalog number, and lot numbers for all reagents used

- Names/version numbers for data analysis software packages or macros
- If referring to previous publications for methods details, include a brief description of the approach, key assumptions and limitations, and any deviations from previously described methods.
- Do not report results unless relevant to explain the rationale for the approaches listed.

For research that involves animals, include all relevant details listed in the latest version of the ARRIVE guidelines, and indicate that the protocol was approved by an institutional animal care and use committee. Provide a rationale for the doses used, and indicate how they compare with environmental exposures experienced by humans.

For research that involves human subjects, include all relevant details listed in an appropriate version of the STROBE or other guidelines. Provide information about institutional review board approval, and either describe informed consent protocols or explain why informed consent was not required.

Results

Report all results on which study conclusions or inferences are based (in whole or in part), including null findings and results of secondary or sensitivity analyses. Report results in full in the main text or in supplemental tables or figures as appropriate (see "Supplemental Material" for a list of materials that may be presented in this section). You may organize the "Results" section using subheadings that describe the nature of the results, but do not use declarative statements indicating your conclusions about the findings.

- Provide a clear and concise description of all findings without extrapolating beyond the results being reported.
- Do not describe methods for the first time in the "Results" section.
- Report results of all analyses and experiments that are described in the manuscript, including sensitivity analyses and secondary analyses, in full, either in the main text or in Supplemental Material. Do not limit results to statistically significant results or selected findings that support the study hypothesis.
- If p -values are used to interpret findings, report actual p -values for all results rather than indicating ranges of p -values or statistical significance only.
- Clearly indicate the number of observations for each analysis or experiment, along with information about missing data.
- Include an appropriate measure of precision or variation (e.g., standard errors, 95% confidence intervals) with all summary estimates and estimates of effect.
- Although *EHP* encourages the use of supplemental tables or figures for secondary findings (see "Supplemental Material" for details), present primary results in the main text. This includes results that are mentioned repeatedly, are related to the primary study aims, or are mentioned in the abstract or manuscript conclusions.
- Provide numeric data used to generate figures as supplemental tables whenever possible.

Discussion

Begin with a brief overview of the main study findings.

- Provide a review of the relevant literature and other information needed to put the study findings into context.
- Provide a complete and balanced view of previous research, including findings that are inconsistent with the hypothesis, results, or conclusions of the present study.
- Describe sources in sufficient detail to ensure that readers can assess the quality and extent of the contribution, including:
 - study type or design
 - sample size
 - population or experimental model
 - specific exposures and outcomes
- Provide a frank discussion of study limitations.
- End with a summary of the key findings and their implications for the study question/hypothesis, future research, and policy, as appropriate.
- Do not describe methods or results for the first time in the "Discussion" section.

Acknowledgments

Include sources of funding for the research (if applicable), such as granting agencies, foundations, private support, etc. Authors may also include (as relevant) specific author contributions, acknowledgment of other contributors, information about data sharing, or names of large cohort groups.

Data Sharing

Information about data sharing protocols, options for accessing data, and links to data repositories may be provided in the “Acknowledgments” section, as noted above. Authors may also provide links to data repositories in the “Methods” or “Results” sections of their manuscripts, as appropriate. As is standard practice, genomics data should be deposited into an acceptable repository (e.g., the National Center for Biotechnology Information).